31971L0393

20.12.1971 *ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV* L 279/7

# DRUHÁ SMERNICA KOMISIE
## z 18. novembra 1971,
## ustanovujúca metódy analýzy na úradnú kontrolu krmív v spoločenstve

(71/393/EHS)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Komisie z 20. júla 1970 ([1]) o zavedení metód spoločenstva na vzorkovanie a analýzu na úradnú kontrolu krmív, zmenenú a doplnenú smernicou z 20. júla 1972, najmä na jej článok 2,

keďže táto smernica požaduje, aby úradné kontroly krmív boli vykonávané použitím metód spoločenstva na vzorkovanie a analýzy s cieľom overenia dodržiavania požiadaviek vyplývajúcich zo zákonných, právnych alebo administratívnych opatrení týkajúcich sa kvality a zloženia krmív;

keďže smernica spoločenstva 71/250/EHS z 15. júna 1971 ([2]) už ustanovila niekoľko metód analýzy; keďže odvtedy vývoj práce potvrdil opodstatnenosť prijať druhý súbor metód;

keďže opatrenia ustanovené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

*Článok 1*

Členské štáty budú požadovať, aby sa analýzy na úradné kontroly krmív s ohľadom na ich obsah vlhkosti, prchavých dusíkatých látok, celkového fosforu, olejov a tukov vykonávali podľa metód opísaných v prílohe k tejto smernici.

Všeobecné ustanovenia uvedené v časti I (Úvod) prílohy k prvej smernici Komisie č. 71/250/EHS z 15. júna 1971, ustanovujúcej metódy analýzy na úradnú kontrolu krmív v spoločenstve budú uplatniteľné aj na metódy opísané v prílohe k tejto smernici.

*Článok 2*

Členské štáty prijmú najneskôr do 1. januára 1973 zákony, iné právne predpisy a administratívne opatrenia nevyhnutné na dosiahnutie súladu s touto smernicou. Bezodkladne o tom budú informovať Komisiu.

*Článok 3*

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 18. novembra 1971

*Za Komisiu*

*predseda*

Franco M. MALFATTI

([1]) Ú. v. ES L 170, 3.8.1970, s. 2.
([2]) Ú. v. ES L 155, 12.7.1971, s. 13.

*PRÍLOHA*

## I. STANOVENIE VLHKOSTI

### 1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanovenie vlhkosti v krmivách. Nezahŕňa analýzu produktov z mlieka ako jednozložkových krmív, analýzu minerálnych látok a zmesí pozostávajúcich najmä z minerálnych látok alebo analýzu olejnatých semien a olejnatého ovocia ustanovených v nariadení Rady 136/66/EHS ([1]) z 22. septembra 1966 o ustanovení spoločnej organizácie trhu s olejmi a tukmi.

Stanovenie vlhkosti v olejnatých semenách a olejnatom ovocí je opísané v prílohe III k nariadeniu Komisie (EHS) č. 1470/68 ([2]) z 23. septembra 1968 o extrakcii a redukcii vzoriek a stanovení obsahu oleja, nečistôt a vlhkosti v olejnatých semenách.

### 2. Podstata

Vzorka sa vysuší za špecifikovaných podmienok, ktoré sa líšia podľa druhu krmiva. Úbytok hmotnosti sa stanoví vážením. V prípade tuhých krmív, ktoré majú vysoký obsah vlhkosti, je potrebné ich predsušenie.

### 3. Prístrojové vybavenie

3.1. Mlynček z materiálu, ktorý neabsorbuje vlhkosť, ľahko sa čistí, umožňuje rýchle mletie bez toho, aby vznikalo zahrievanie, čo najviac zamedzuje kontaktu s okolitým vzduchom a spĺňa požiadavky uvedené nižšie v 4.1.1. a 4.1.2. (napr. kladivkové alebo vodou chladené mikromlynčeky, rozoberateľné kužeľové mlynčeky, nízkootáčkové mlynčeky alebo mlynčeky s ozubenými kolesami).

3.2. Analytické váhy s presnosťou na 0,5 mg.

3.3. Suché sušičky z nekorodujúcich kovov alebo zo skla s vrchnákmi umožňujúcimi vzduchotesné uzatvorenie; s pracovným povrchom, na ktorom je možné rozprestrieť skúšobnú vzorku vo vrstve približne 0,3 g/m$^2$

3.4. Elektricky vyhrievaná izotermická sušiareň (± 1 °C), primerane vetraná, s možnosťou rýchlej regulácie teploty ([3]).

3.5. Regulovateľná elektricky vyhrievaná vákuová sušiareň vybavená olejovou pumpou a mechanizmom, ktorý buď privádza horúci suchý vzduch alebo sušiacu látku (napr. oxid vápenatý).

3.6. Exsikátor s hrubou perforovanou kovovou alebo porcelánovou platňou obsahujúci účinnú sušiacu látku.

### 4. Postup

*N.B.:* Postupy opísané v tomto oddieli sa musia vykonať ihneď po otvorení balíčkov so vzorkami. Analýza sa musí vykonať aspoň dvakrát.

4.1. *Príprava*

4.1.1. *Krmivá iné ako krmivá patriace pod body 4.1.2. a 4.1.3.*

Odoberte aspoň 50 g vzorky. Ak je potrebné, pomeľte alebo rozdrvte ju takým spôsobom, aby sa zamedzilo akejkoľvek odchýlke v obsahu vlhkosti (pozri 6).

4.1.2. *Obilniny a obilné krúpy*

Odoberte aspoň 50 g vzorky. Pomeľte ju na častice, z ktorých najmenej 50 % prepadne sitom s veľkosťou ôk 0,5 mm a zvyšok na site s okrúhlymi okami o veľkosti 1 mm bude najviac 10 %.

([1]) Ú. v. ES 127, 30.9.1966, s. 3025/66.
([2]) Ú. v. ES L 239, 28.9.1968, s. 2.
([3]) Pri sušení obilnín, múky, krúp a šrotu musí mať sušiareň takú tepelnú výkonnosť, aby sa jej teplota nastavená na 131 °C, po vložení najväčšieho počtu skúšobných vzoriek na súčasné sušenie, vrátila na pôvodnú hodnotu do 45 minút. Vetranie sušiarne musí byť také, aby bol rozdiel medzi výsledkami sušenia najväčšieho počtu vzoriek bežnej pšenice počas dvoch hodín a výsledkami získanými po štvorhodinovom sušení menší ako 0,15 %.

4.1.3. *Krmivá tekuté, pastovité, krmivá prevažne zložené z olejov a tukov*

Odoberte približne 25 g vzorky, odvážte s presnosťou na 10 mg, pridajte potrebné množstvo bezvodého piesku odváženého s presnosťou na 10 mg a miešajte, až kým nezískate homogénny produkt.

4.2. *Sušenie*

4.2.1. *Krmivá iné ako krmivá patriace pod body 4.2.1. a 4.2.3.*

Odvážte sušičku (3.3.) s vrchnákom s presnosťou na 0,5 mg. Do odváženej sušičky navážte s presnosťou na 1 mg približne 5 g vzorky a rovnomerne ju rozložte. Vložte sušičku s odklopeným vrchnákom do sušiarne predhriatej na teplotu 103 °C, a to čo najrýchlejšie, aby sa zamedzilo neželanému poklesu teploty. Vzorka sa suší štyri hodiny, ktoré sa počítajú od času, keď sa teplota v sušiarni vráti na 103 °C. Položte na sušičku vrchnák, vyberte ju z pece, v exsikátore ju nechajte vychladnúť 30 až 45 minút (3.6.) a odvážte s presnosťou na 1 mg.

Krmivá zložené prevažne z olejov a tukov sušte v sušiarni ešte ďalších 30 minút pri teplote 130 °C. Rozdiel medzi dvoma váženiami nesmie presiahnuť 0,1 % vlhkosti.

4.2.2. *Obilniny, múka, krúpy a šrot*

Odvážte sušičku (3.3.) s vrchnákom s presnosťou na 0,5 mg. Do odváženej sušičky navážte s presnosťou na 1 mg približne 5 g pomletej vzorky a rovnomerne ju rozložte. Vložte sušičku s odklopeným vrchnákom do sušiarne predhriatej na teplotu 130 °C, a to čo najrýchlejšie, aby sa zamedzilo neželanému poklesu teploty. Nechajte vzorku sušiť dve hodiny, ktoré sa počítajú od času, keď sa teplota vráti na hodnotu 130 °C. Na sušičku položte vrchnák, vyberte ju z pece, nechajte ju v exsikátore (3.6.) vychladnúť 30 až 45 minút a odvážte s presnosťou na 1 mg.

4.2.3. *Krmne zmesi obsahujúce viac ako 4 % sacharózy alebo laktózy: jednozložkové krmivá, ako je svätojánsky chlieb, hydrolyzované obilninové produkty, slad, sušené repné rezky, šťavy z rýb a cukru; krmne zmesi obsahujúce viac ako 25 % minerálnych solí vrátane vody z kryštalizácie.*

Navážte sušičku (3.3.) s vrchnákom s presnosťou na 0,5 mg. Do odváženej sušičky navážte s presnosťou na 1 mg približne 5 g vzorky a rovnomerne ju rozložte. Vložte sušičku s odklopeným vrchnákom do vákuovej sušiarne (3.5.) predhriatej na teplotu medzi 80 °C a 85 °C, a to čo najrýchlejšie, aby sa zamedzilo neželanému poklesu teploty.

Nastavte tlak na 100 torrov a nechajte pri tomto tlaku sušiť štyri hodiny buď pod prúdom horúceho suchého vzduchu, alebo použite sušiaci prostriedok (približne 300 g na 20 vzoriek). Pri použití sušiacej látky odpojte vákuové čerpadlo, hneď, ako sa dosiahne predpísaný tlak. Čas sušenia počítajte od momentu, keď sa teplota v sušiarni vráti na hodnotu od 80 °C do 85 °C. Opatrne vráťte sušiareň na atmosferický tlak. Potom ju otvorte, ihneď položte na sušičku vrchnák, vyberte ju zo sušiarne, nechajte v exsikátore (3.6.) vychladnúť 30 až 45 minút a odvážte s presnosťou na 1 mg. Sušte ďalších 30 minút vo vákuovej sušiarni pri teplote od 80 °C do 85 °C a prevážte. Rozdiel medzi dvoma váženiami nesmie presiahnuť 0,1 % vlhkosti.

4.3. *Predsušenie*

4.3.1. *Krmivá iné ako krmivá patriace pod 4.3.2.*

Tuhé krmivá s vysokým obsahom vlhkosti, ktoré spôsobujú problémy pri mletí, sa musia predsušiť podľa nasledujúceho postupu:

Navážte 50 g nepomletej vzorky s presnosťou na 10 mg (lisované alebo granulované krmivá sa môžu v prípade potreby rozdrviť nahrubo) vo vhodnej sušičke (napr. hliníková platňa s veľkosťou 20 x 12 cm s 0,5 cm rámom). Nechajte sušiť v sušiarni pri teplote od 60 °C do 70 °C, až kým sa vlhkosť nezníži na 8 % až 12 %. Vyberte zo sušiarne, nechajte chladnúť 1 hodinu nezakryté v laboratórnom prostredí a odvážte s presnosťou na 10 mg. Potom ihneď pomeľte podľa návodu v bode 4.1.1. a sušte tak, ako je uvedené v bodoch 4.2.1. alebo 4.2.3. podľa druhu krmiva.

4.3.2. *Obilniny*

Obilné zrná s vlhkosťou vyššou ako 17 % sa musia predsušiť, a to nasledovným postupom:

Navážte 50 g nepomletých zŕn s presnosťou na 10 mg vo vhodnej sušičke (napr. hliníková platňa s veľkosťou 20 x 12 cm s 0,5 cm rámom). Nechajte sušiť v sušiarni 5 až 7 minút pri teplote 130 °C. Vyberte zo sušiarne, nechajte vychladnúť dve hodiny nezakryté v laboratórnom prostredí a odvážte s presnosťou na 10 mg. Potom ihneď pomeľte podľa postupu v bode 4.1.2. a vysušte tak, ako je uvedené v bode 4.2.2.

5. **Výpočet výsledkov**

Obsah vlhkosti udaný ako percento zo vzorky sa vypočíta podľa rovnice:

5.1. *Sušenie bez presušenia*

$$(E-m)\cdot\frac{100}{E}$$

kde:

E = počiatočná hmotnosť skúšobnej vzorky v gramoch,

m = hmotnosť suchej skúšobnej vzorky v gramoch.

5.2. *Sušenie s predsušením*

$$\left[\frac{(M'-m)M}{M'}+E-M\right]\cdot\frac{100}{E}=100\left(1-\frac{Mm}{EM'}\right)$$

kde:

E = pôvodná hmotnosť skúšobnej vzorky v gramoch,

M = hmotnosť vzorky po predsušení v gramoch,

M = hmotnosť vzorky po drvení alebo mletí v gramoch,

m = hmotnosť vysušenej skúšobnej vzorky v gramoch.

5.3. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,2 % vlhkosti.

6. **Pozorovanie**

Ak vzorku treba upraviť mletím a ak sa zdá, že táto úprava zmení obsah vlhkosti produktu, výsledky analýzy zložiek krmív sa musia upraviť na základe obsahu vlhkosti vzorky v jej pôvodnom stave.

## II. STANOVENIE PRCHAVÝCH DUSÍKATÝCH LÁTOK

### A. MIKRODIFÚZIA

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu prchavých dusíkatých látok v krmivách vyjadrených ako amoniak.

2. **Podstata**

Vzorka sa extrahuje vodou a získaný roztok sa prečistí a prefiltruje. Prchavé dusíkaté látky sú vytesnené mikrodifúziou za použitia roztoku uhličitanu draselného, zachytené v roztoku kyseliny boritej a stitrované kyselinou sírovou.

3. **Činidlá**

3.1. 20 % (hmotnosť/objem) roztok kyseliny trichlóroctovej.

3.2. Indikátor: rozpustite 33 mg brómkrezolovej zelene a 65 mg metylčervene v 100 ml 95 % – 96 % (obj/obj) etanolu.

3.3. Roztok kyseliny boritej: v odmernej banke s objemom 1 l rozpustite 10 g kyseliny boritej p. a. v 200 ml 95 % – 96 % (obj/obj) etanolu a 700 ml vody. Pridajte 10 ml indikátora (3.2.). Premiešajte, a keď je to potrebné, upravte farbu roztoku na svetločervenú pridaním roztoku hydroxidu sodného. V 1 ml tohto roztoku sa zachytí najviac 300 μg $NH_3$.

3.4. Nasýtený roztok uhličitanu draselného: rozpustite 100 g uhličitanu draselného p. a. v 100 ml vriacej vody. Nechajte vychladnúť a prefiltrujte.

3.5. Kyselina sírová 0,02 N.

4. **Prístrojové vybavenie**

4.1. Mixér (trepačka): približne 35 – 40 ot./min.

4.2. Sklenené alebo plastové Conwayove misky (pozri diagram).

4.3. Mikrobyrety delené na 1/100 ml.

5. **Postup**

Navážte 10 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte ju do 200 ml odmernej banky, do ktorej pridáte 100 ml vody. Miešajte 30 minút v trepačke. Pridajte 50 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej (3.1.), doplňte vodou na celkový objem, dôkladne pretrepte a prefiltrujte cez skladaný filter.

Za použitia pipety vkvapnite 1 ml roztoku kyseliny boritej (3.3.) do strednej časti Conwayovej misky a 1 ml filtrátu vzorky do medzikružia misky. Čiastočne prikryte vazelínou natretým vrchnákom. Rýchlo prikvapnite 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu draselného (3.4.) do medzikružia misky a vzduchotesne uzatvorte vrchnákom. Opatrne otáčajte misku v horizontálnej polohe tak, aby sa zmiešali obe činidlá. Nechajte inkubovať aspoň štyri hodiny pri izbovej teplote alebo hodinu pri teplote 40 °C.

Prchavé látky v roztoku kyseliny boritej stitrujte za použitia mikrobyrety (4.3.) s 0,02 N kyseliny sírovej (3.5.).

Použitím rovnakého postupu vykonajte slepú skúšku, ale bez vzorky na analýzu.

6. **Výpočet výsledkov**

1 ml 0,02 N roztoku $H_2SO_4$ zodpovedá 0,34 mg amoniaku.

Vyjadrite výsledok ako percentá zo vzorky.

*Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

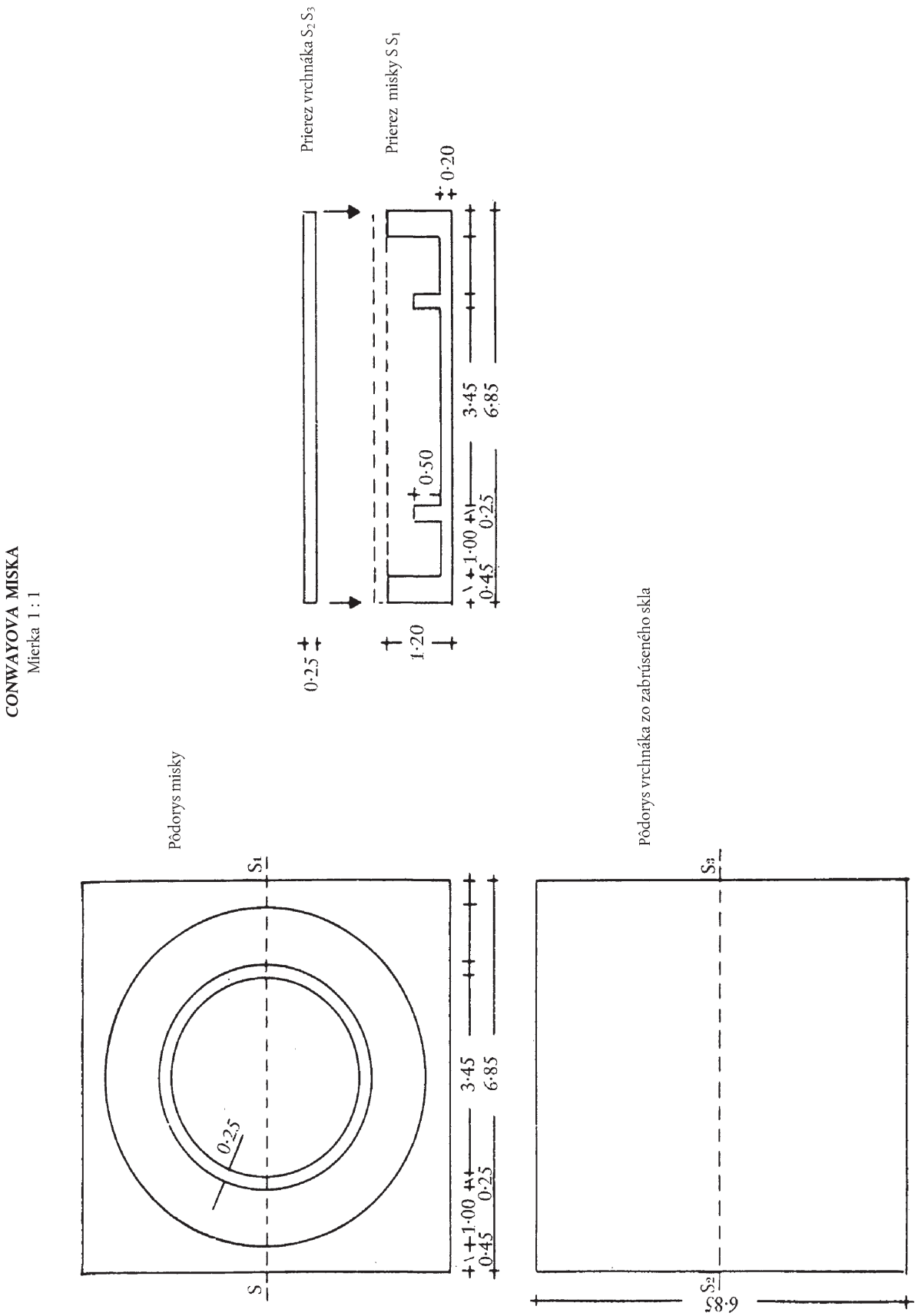
10 % v relatívnej hodnote pri obsahoch amoniaku nižších ako 1,0 %;

0,1 % v absolútnej hodnote pri obsahoch amoniaku 1,0 % alebo vyšších.

7. **Pozorovanie**

Ak obsah amoniaku vo vzorke presiahne 0,6 %, zrieďte počiatočný filtrát.

**CONWAYOVA MISKA**
Mierka 1 : 1



B. DESTILAČNÁ METÓDA

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu prchavých dusíkatých látok vyjadrených ako amoniak, v rybej múčke prakticky neobsahujúcej močovinu. Je uplatniteľná len na vzorky s obsahom amoniaku menším ako 0,25 %.

2. **Podstata**

Vzorka sa extrahuje vodou a získaný roztok sa prečistí a prefiltruje. Prchavé dusíkaté látky sú vytesnené pri bode varu pridaním oxidu horečnatého a zachytené v určitom množstve kyseliny sírovej, ktorej nadbytok je spätne stitrovaný roztokom hydroxidu sodného.

3. **Činidlá**

3.1. 20 % (hmotnosť/objem) roztok kyseliny trichlóroctovej.

3.2. Oxid horečnatý, p. a..

3.3. Emulzia proti peneniu (napr. silikón).

3.4. Kyselina sírová, roztok 0,1 N.

3.5. Hydroxid sodný, roztok 0,1 N.

3.6. Metylčerveň, roztok 0,3 % (hmotnosť/objem) v 95 % – 96 % (obj./obj.) etylalkohole.

4. **Prístrojové vybavenie**

4.1. Mixér (trepačka): približne 35 – 40 ot./min.

4.2. Kjeldahlov destilačný prístroj.

5. **Postup**

Navážte 10 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte ju do 200 ml odmernej banky, do ktorej pridáte 100 ml vody. Miešajte 30 minút v trepačke. Pridajte 50 ml roztoku kyseliny trichlóroctovej (3.1.), doplňte vodou na celkový objem, dôkladne pretrepte a prefiltrujte cez skladaný filter.

Vezmite určité množstvo čistého filtrátu vhodného na predpokladaný obsah prchavých dusíkatých látok (100 ml je obvykle vhodný objem). Zrieďte na 200 ml a pridajte 2 g oxidu horečnatého (3.2.) a niekoľko kvapiek emulzie proti peneniu (3.3.). Roztok musí reagovať na lakmusový papier zásadito, v opačnom prípade pridajte trochu oxidu horečnatého (3.2.). Oddestilujte približne 150 ml roztoku v Kjeldahlovom prístroji, a potom destilát obsahujúci presne odmeraný objem (25 až 50 ml) 0,1 N roztoku kyseliny sírovej (3.4.) zachyťte do Erlenmeyerovej banky. Počas destilácie sa vyhýbajte prehriatiu stien banky. Varte roztok kyseliny sírovej dve minúty, ochladťe ju a spätnou titráciou 0,1 N roztokom hydroxidu sodného (3.5.) za prítomnosti indikátora metylčervene (3.6.) stitrujte nadbytok kyseliny sírovej.

Použitím rovnakého postupu vykonajte *slepú skúšku*, ale bez vzorky na analýzu.

6. **Výpočet výsledkov**

1 ml 0,1 N roztoku $H_2SO_4$ zodpovedá 1,7 mg amoniaku.

Vyjadrite výsledok ako percentá zo vzorky.

*Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie v relatívnych hodnotách prekročiť 10 % amoniaku.

## III. STANOVENIE CELKOVÉHO FOSFORU

FOTOMETRICKÁ METÓDA

### 1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu celkového fosforu v krmivách. Je obzvlášť vhodná na analýzu produktov s nízkym obsahom fosforu. V niektorých prípadoch (produkt bohatý na fosfor) je možné použiť gravimetrickú metódu.

### 2. Podstata

Vzorka je mineralizovaná buď suchým spaľovaním (v prípade organických krmív), alebo rozkladom kyselinou (v prípade minerálnych zložiek a tekutých krmív) a umiestnená do roztoku kyseliny. Roztok sa upraví molybdátovanádovým činidlom. Optická hustota takto vzniknutého žltého roztoku sa meria spektrofotometrom pri 430 nm.

### 3. Činidlá

3.1. Uhličitan vápenatý, p. a.

3.2. Kyselina chlorovodíková, p. a., hustota: 1,1 (približne 6 N).

3.3. Kyselina dusičná, p. a., hustota: 1,045.

3.4. Kyselina dusičná, p. a., hustota: 1,38 až 1,42.

3.5. Kyselina sírová, p. a., hustota: 1,84.

3.6. Molybdátovanádové činidlo: zmiešajte 200 ml roztoku heptamolybdénanu amónneho (3.6.1.), 200 ml roztoku vanadičnanu amónneho (3.6.2.) a 134 ml kyseliny dusičnej (3.4.) v 1 l odmernej banke. Doplňte destilovanou vodou na celkový objem.

3.6.1. Roztok heptamolybdénanu amónneho: rozpustite v horúcej vode 100 g heptamolybdénanu amónneho, p. a..

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}{}^4H_2O$. Pridajte 10 ml amoniaku (hustota: 0,91) a doplňte destilovanou vodou na objem 1 l.

3.6.2. Roztok vanadičnanu amónneho: 2,35 g vanadičnanu amónneho, p. a., $NH_4VO_3$ rozpustite v 400 ml horúcej destilovanej vody. Za stáleho miešania pomaly pridajte 20 ml zriedenej kyseliny dusičnej (7 ml $HNO_3$ (3.4.) + 13 ml $H_2O$ a doplňte destilovanou vodou na objem 1 litra.

3.7. Štandardný roztok 1 mg fosforu na 1 ml: vo vode rozpustite 4,387 g dihydrofosforečnanu draselného $KH_2PO_4$, p. a.. Doplňte vodou na objem 1 litra.

### 4. Prístrojové vybavenie

4.1. Kremenná alebo porcelánová spaľovacia miska.

4.2. Elektrická muflová pec s termostatom do 550 °C.

4.3. 250 ml Kjeldahlova banka.

4.4. Odmerné banky a presné pipety.

4.5. Spektrofotometer.

4.6. Skúmavky o priemere asi 16 mm, so zátkami o priemere do 14,5 mm; objeme: 25 – 30 ml.

### 5. Postup

5.1. *Príprava roztoku*

Pripravte roztok podľa druhu vzorky, ako je uvedené v 5.1.1. alebo 5.1.2.

5.1.1. *Obvyklý postup*

Navážte 1 g alebo väčšie množstvo vzorky s presnosťou na 1 mg. Skúšobnú vzorku vložte do Kjeldahlovej banky, pridajte 20 ml kyseliny sírovej (3.5.), pretrepte, aby sa látka úplne nasýtila kyselinou, zamedzte jej prilepeniu na steny banky, zahrejte a 10 minút udržujte na bode varu. Nechajte pomaly vychladnúť, pridajte 2 ml kyseliny dusičnej (3.4.), jemne zahrejte, nechajte pomaly vychladnúť, pridajte trochu viac kyseliny dusičnej (3.4.) a priveďte znovu do bodu varu. Tento postup opakujte, až kým nezískate bezfarebný roztok. Ochlaďte, pridajte trochu vody, zlejte kvapalinu do 500 ml odmernej banky, Kjeldahlovu banku vypláchnite horúcou vodou. Nechajte vychladnúť, doplňte vodou do celkového objemu, zhomogenizujte a prefiltrujte.

5.1.2. *Vzorky obsahujúce organické látky a vzorky bez dihydrofosforečnanov vápenatých a horečnatých.*

Naváž̌te 2,5 g vzorky s presnosťou na 1 mg do spaľovacej misky. Miešajte skúšobnú vzorku, až kým sa úplne nespojí s 1 g uhličitanu vápenatého (3.1.). Žíhajte v peci pri teplote 550 °C ± 5 °C, až kým nezískate biely alebo šedý popol (trochu dreveného uhlia neprekáža). Preneste popol do 250 ml kadičky. Pridajte 20 ml vody a kyselinu chlorovodíkovú (3.2.), až kým neprestane šumieť. Pridajte ďalších 10 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.2.). Uložte kadičku do pieskového kúpeľa a odparujte do sucha, čím kremeň sa prevedie na nerozpustnú formu. Rozpustite zvyšok v 10 ml kyseliny dusičnej (3.3.) a varte v pieskovom kúpeli 5 minút bez odparovania do sucha. Zlejte kvapalinu do 500 ml odmernej banky, kadičku niekoľkokrát vypláchnite horúcou vodou. Nechajte vychladnúť, doplňte vodou do celkového objemu, zhomogenizujte a prefiltrujte.

5.2. *Vyfarbenie a meranie optickej hustoty*

Zrieďte alikvotnú časť filtrátu získaného podľa 5.1.1 alebo 5.1.2, aby ste získali koncentráciu fosforu, nie väčšiu ako 40 μg/ml. Do skúmavky (4.6) vlejte 10 ml tohto roztoku a pridajte 10 ml molybdátovanádového činidla (3.6). Zhomogenizujte a nechajte postáť najmenej 10 minút pri teplote 20 °C. Zmerajte optickú hustotu v spekrofotometri pri 430 nm oproti roztoku získanému pridaním 10 ml molybdátovanádového činidla (3.6) do 10 ml vody.

5.3. *Kalibračná krivka*

Zo štandardného roztoku (3.7.) pripravte roztoky obsahujúce 5, 10, 20, 30 a 40 μg fosforu na ml. Zoberte 10 ml z každého roztoku a pridajte do nich 10 ml molybdátovanádového činidla (3.6.). Zhomogenizujte a nechajte stáť najmenej 10 minút pri teplote 20 °C. Zmerajte optickú hustotu, ako je uvedené v 5.2.

Zostrojte kalibračnú krivku vynesením optických hustôt oproti zodpovedajúcim množstvám fosforu. Pri koncentráciách medzi 0 a 40 μg bude krivka lineárna.

6. **Výpočet výsledkov**

Použitím kalibračnej krivky stanovte množstvo fosforu v skúšobnej vzorke.

Vyjadrite výsledok ako percentá zo vzorky.

*Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť:

3 % v relatívnej hodnote pri obsahoch fosforu nižšom ako 5 %;

0,15 % v absolútnej hodnote pri obsahoch fosforu 5 % alebo viac.

## IV. STANOVENIE OLEJOV A TUKOV

1. **Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanovenie obsahu olejov a tukov v krmivách. Nezahŕňa analýzu olejnatých semien a olejnatého ovocia definovaných v nariadení Rady 136/66/EHS z 22. septembra 1966. Stanovenie obsahu oleja v takýchto produktoch je opísané v prílohe V k nariadeniu Komisie (EHS) 1470/68 z 23. septembra 1968.

Je možné použiť každú z uvedených dvoch metód, výber závisí od druhu krmiva.

1.1. *Metóda A* (extrakcia éterom): je uplatniteľná na všetky krmivá iné ako tie, ktoré patria do 1.2.

1.2. *Metóda B*: je uplatniteľná na krmivá, z ktorých nemôžeme tuky a oleje úplne vyextrahovať použitím dietyléteru bez ich predchádzajúcej hydrolýzy, na krmivá živočíšneho pôvodu, glutény, sušené zemiakové rezky, sušené pivovarské s liehovarské výpalky a odpady, sušené kvasnice, odpad z pečiva, chleba a varených jedál, produkty z mlieka a krmivá obsahujúce vysoký podiel týchto produktov (aspoň 40 %) a na kŕmne zmesi obohatené tukmi.

2. **Podstata**

2.1. *Metóda A*: Oleje a tuky sa vyextrahujú dietyléterom. Rozpúšťadlo sa oddestiluje a zvyšok sa vysuší a odváži.

2.2. *Metóda B*: Vzorka sa hydrolyzuje kyselinou chlorovodíkovou za varu. Roztok sa ochladí a prefiltruje. Zvyšok sa premýva, vysuší a extrahuje dietyléterom podľa metódy A.

3. **Činidlá**

3.1. Dietyléter bezvodý, hustota: 0,720; bod varu: 34,5 °C, prakticky bez peroxidov.

3.2. Síran sodný bezvodý, p. a.

3.3. Kyselina chlorovodíková 3 N.

3.4. Filtračná pomôcka, napr. kysličník kremičitý, Hyflo-supercel.

3.5. Chlorid uhličitý, p. a.

4. **Prístrojové vybavenie**

4.1. Extrakčný prístroj podľa Soxhleta typu alebo ekvivalentný prístroj.

4.2. Vyhrievacie zariadenie, odolné proti výbuchu, s regulovateľnou teplotou.

4.3. Vákuová sušiareň (menej ako 100 torrov).

5. **Postup**

5.1. *Metóda A: (pozri 7.1.)*

Navážte 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg a zmiešajte s 2 až 3 g (alebo viac, ak je potrebné) bezvodého síranu sodného (3.2.). Umiestnite zmes do beztukovej extrakčnej tuby a prikryte ju chumáčom beztukovej vaty. (Zmiešanie môže prebehnúť aj v tube.)

Vložte tubu do extrakčného prístroja (4.1.) a extrahujte dietyléterom (3.1.) šesť hodín. Ak sa použije extrakčný prístroj podľa Soxhleta, nastavte vyhrievanie tak, aby ste dosiahli aspoň 15 extrakčných cyklov za hodinu. Éterový extrakt zhromaždite v suchej odváženej banke, v ktorej sa nachádzajú kúsky pemzy ([1]).

Oddestilujte éter a zvyšok sušte odparovaním hodinu a pol vo vákuovej sušiarni (4.3.) pri teplote 75 °C. Ochladťe v exsikátore a odvážte. Opäť sušte, aby hmotnosť oleja a tukov zostala konštantná (strata na hmotnosti musí byť menšia ako 1 mg).

5.2. *Metóda B*

Navážte 2,5 g vzorky s presnosťou na 1 mg (pozri 7.2.) a dajte ju do 400 ml kadičky alebo 300 ml Erlenmeyerovej banky. Pridajte 100 ml 3 N kyseliny chlorovodíkovej (3.3.) a kúsky pemzy. Prikryte kadičku s hodinovým sklíčkom alebo pripojte spätný chladič na Erlenmeyerovu banku. Priveďte zmes do mierneho varu na nízkom plameni alebo na horúcej platni a udržiavajte to tak jednu hodinu. Nedovoľte, aby sa produkt usadil na stenách nádoby.

([1]) Ak olej alebo tuk musí prejsť následnými testmi kvality, namiesto úlomkov pemzy použite sklenené guľôčky.

Ochladťte a pridajte toľko filtračnej pomôcky (3.4.), koľko postačí na zamedzenie stratám oleja alebo tuku počas filtrácie. Filtrujeme cez navlhčený, beztukový dvojitý filtračný papier. Zvyšok premyjeme studenou vodou do vymiznutia kyslej reakcie. Skontrolujte, či filtrát neobsahuje žiaden olej alebo tuky. Ich prítomnosť vo filtráte dokazuje, že vzorka sa musí extrahovať dietyléterom pred hydrolýzou použitím metódy uvedenej v 5.1.

Vložte dvojitý filtračný papier so zvyškom na hodinové sklíčko a sušte v sušiarni jeden a pol hodiny pri teplote 95 °C až 98 °C.

Vložte dvojitý filtračný papier so suchým zvyškom do extrakčnej tuby a extrahujte dietyléterom a postupujte podľa druhého odseku bodu 5.1.

6. **Výpočet výsledkov**

Vyjadrite výsledok ako percentá zo vzorky.

*Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie presiahnuť 0,3 % oleja alebo tuku.

7. **Pozorovania**

7.1. Pri produktoch s vysokým obsahom olejov alebo tukov a ktoré je ťažké rozdrviť alebo sú nevhodné na prípravu homogénnej redukovanej skúšobnej vzorky, postupujte nasledovne: odvážte 20 g vzorky s presnosťou na 1 mg a zmiešajte s 10 g (alebo viac, ak je potrebné) bezvodého síranu sodného (3.2.). Extrahujte dietyléterom (3.1.), ako je uvedené v 5.1. Doplňte získaný extrakt chloridom uhličitým (3..) na objem 500 ml a zhomogenizujte. Vezmite 50 ml roztoku a dajte ho do malej suchej odváženej banky s kúskami pemzy ([1]). Oddestilujte rozpúšťadlo, vysušte a postupujte ďalej podľa posledného odseku bodu 5.1. Odstráňte rozpúšťadlo z extrakčného zvyšku, ktorý zostal v extrakčnej tube, a rozdrvte zvyšky na jemnosť s veľkosťou častíc do 1 mm. Vráťte produkt do extrakčnej tuby (nepridávajte síran sodný), extrahujte dietyléterom a postupujte tak, ako je uvedené v druhom a treťom odseku bodu 5.1.

Vypočítajte výsledok ako percentá zo vzorky, do výpočtu zahrňte alikvotnú časť použitú pri prvej extrakcii podľa nasledujúceho vzorca:

$$(10\,a + b)\cdot 5$$

**kde:**

a = éterový extrakt z alikvotnej časti po prvej extrakcii v gramoch

b = éterový extrakt z druhej extrakcie v gramoch.

7.2. Pri produktoch s nízkym obsahom olejov a tukov sa môže skúšobná vzorka zvýšiť na 5 g.

([1]) Ak olej alebo tuk musí prejsť následnými testmi kvality, namiesto úlomkov pemzy použite sklenené guľôčky.